

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08334509 A**

(43) Date of publication of application: **17 . 12 . 96**

(51) Int. Cl.

**G01N 33/543**

(21) Application number: **07143715**

(22) Date of filing: **09 . 06 . 95**

(71) Applicant: **NISSHINBO IND INC**

(72) Inventor: **SUZUKI OSAMU  
SASAKI NAOICHI  
ICHIHARA TATSUO  
OKADA SANAE**

**(54) METHOD FOR ANALYZING BIOLOGICALLY  
ACTIVE SUBSTANCE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To simply, efficiently and strongly bond such active substance as protein, nucleic acid, etc., to a carrier.

CONSTITUTION: In a method for analyzing a first substance or a second substance in a sample by enabling a biologically active first substance which is

immobilized to a carrier to react with a second substance which can specifically bond to the first substance and detecting the second substance which is indirectly bonded to the carrier or the second substance which is not bonded to the carrier via the bond between the first and second substances, the carrier is caused to carry a compound with 2-100 carbodiimide groups, and the first substance is immobilized to the carrier through the carbodiimide group.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 担体に固定化された生物学的に活性な第 1 の物質と、この第 1 の物質に特異的に結合し得る第 2 の物質とを反応させ、

前記第 1 の物質と第 2 の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第 2 の物質又は結合しない第 2 の物質を検出することにより、試料中の第 1 の物質又は第 2 の物質を分析する方法において、

前記担体はカルボジイミド基を 2～100 個有する化合物を含み、前記第 1 の物質はカルボジイミド基を介して担体に固定化されることを特徴とする、生物学的に活性な物質の分析法。

【請求項 2】 前記第 1 の物質と第 2 の物質とを反応させる際に、さらに標識物質で標識された第 2 の物質を反応系に加えることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記第 1 の物質と第 2 の物質とを反応させた後に、第 2 の物質に特異的に結合し得る第 3 の物質を反応させることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 前記第 3 の物質が標識物質で標識された請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 前記第 1 の物質は核酸であり、第 2 の物質はこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有する核酸である請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】 前記第 1 の物質は、タンパク質、ペプチドまたはその他の抗体結合性物質であり、第 2 の物質はこれに特異的に結合し得るタンパク質、ペプチドまたはその他の抗体結合性物質である請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】 前記担体が乳濁状である請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】 カルボジイミド基を有する化合物の分子量が、1000 以上、100,000 以下である請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】 標識物質が、放射性物質、蛍光物質、酵素、色素、化学発光物質、ヒオチン、アビジン、ストレプトアビジン及びジゴキシゲニンから選ばれる請求項 2 又は 4 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、核酸、抗体、抗原など生物学的に活性な物質を検出するための材料及びそのための方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】臨床検査、食品検査、法医学検査などの分野において、検体中に存在する核酸、抗体、抗原など生物学的に活性な物質を検出、同定する方法として、目的物質に応じて核酸プローブ法、酵素免疫測定法などが用いられている。

【0003】核酸を検出する分野としては、病原微生物などの菌種同定、法医学における DNA 鑑定などがある。核酸の検出においては、通常、標的となる核酸と相

補的な配列を有する核酸を用い、このものを酵素などで直接、またはハプテンなどを介して間接的に標識する。この標識核酸と標的となる核酸をハイブリダイズさせる。ハイブリダイズしなかった標識核酸を除くかまたは標識部分を不活性化したのちに、標識部分を検出する事により標的核酸の存在及び量を確認できる。

【0004】また、抗原、抗体などを検出する分野としては、核酸と同様に病原微生物などの菌種同定の他、種々の臨床検査などがある。抗原、抗体の検出に用いられる酵素免疫測定法の 1 態様である競合的酵素免疫測定法は、次のようにして行われる。ポリスチレンビーズ、マイクロタイタープレート、チューブなどの固相表面に抗体または抗原を固定化し、固相表面に一定量の検体溶液を添加した後、抗原酵素複合体または抗体酵素複合体を加える。固相表面に抗体を固定化した場合には、検体中の抗原と抗原酵素複合体とが固相表面に固定化された抗体との結合反応において競合し、固相表面に抗原を固定化した場合には、検体中の抗原と固相表面に固定化された抗原とが抗体酵素複合体と結合反応で競合させる。

【0005】一定時間経過後に、抗体を固定化した場合には、固定化抗体に結合していない抗原および抗原酵素複合体を洗浄し除去する。また、抗原を固定化した場合には、未反応の検体中の抗原、抗体酵素複合体および検体中の抗原と抗体-酵素複合体との結合物を洗浄し除去する。このときの洗浄は、洗浄液を固相部に満たしたのち、洗浄液を捨て、再び固相部に洗浄液を満たして捨てるという洗浄操作を通常数回から十回程度繰り返す。この操作を一般に B/F 分離と呼び、酵素免疫測定法を原理とする検査では必須の操作である。

【0006】最後に、抗原又は抗体の標識に用いた酵素に対する発色基質液を固相部に加えて、残存する酵素により発色させる。このとき用いる酵素はペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが一般的である。発色に用いる基質はそれぞれの酵素に適したものをを用いる。検体液中に標的となる抗原が多く存在すれば残存する抗原酵素複合体あるいは抗体酵素複合体の量が減り、結果として発色強度が弱くなる。発色強度は一般的に比色計を用いて測定する。

【0007】また、酵素免疫測定法の他の態様であるサンドイッチ酵素免疫測定法では、抗体を固相表面に固定化し、固相表面に検体液を加える。一定時間経過後、固相表面の抗体に結合していない抗原を洗浄し除去する。次いで抗体酵素複合体を一定量加える。一定時間経過後、固相表面の抗原に結合していない抗体酵素複合体を洗浄除去したのち、固相表面に発色基質を加えて発色させる。この発色強度を測定することにより、検体液中の抗原濃度を定量することが可能になる。

【0008】上述のように従来の核酸の検出法、競合的酵素免疫法、サンドイッチ酵素免疫法などにおいては、チューブ、マイクロタイタープレート、メンブランフイ

ルター、ビーズなどの固相表面に抗体、抗原、酵素、核酸などを固定化することが非常に重要である。そのため、生物学的活性物質を固定化する種々の方法が公表されている。たとえば、タンパク質では、

①ジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による基材結合法や Ugi 反応による基材結合法などのような、タンパク質を架橋剤や縮合剤等を用いて基剤に化学結合させる方法（「固定化酵素」〔千畑一郎 編、講談社サイエンティフィック（1986）〕第 9-41 ページ参照）、

②イオン結合により基剤に固定する方法（「固定化酵素」第 41-43 ページ参照）、

③物理吸着により基剤に固定する方法（「固定化酵素」第 43-45 ページ参照）、  
などが知られている。

【0009】また核酸では、

①5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定（P. J.R.Day, P.S.Floria, J.E.Fox, M.R.Walker, Biochem. J., 278, 735-740 (1991) 参照）などのような修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法（尚、この範疇に属する他の方法については、Soren R.R., Mette R.L., Svend E.R., Anal. Biochem., 198, 138-142 (1991), Jonathan N.K., Joseph L.W., Joseph P.D., Rachel E.M., Mary C., Eugene L.B., Nucleic Acids Res., 15, 2891-2909 (1987), Allan J.M., Jeffrey R.B., Terence W. P., Biochem. J., 191, 855-858 (1980), J.A.Running, M.S.Urdea, BioTechniques, 8, 276-279 (1990) などに記載されている。）

②核酸を、UV 照射あるいは加熱処理によりニトロセルロースまたはナイロン膜上に吸着固定（J.Sambrook, E. F.Fritsch and T.Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, page 2.109-2.113 and page 9.34-9.46）したり、マイクロプレート上に物理吸着させ固定（G.C.N.Parry and A.D. B.Malcolm, Biochem. Soc. Trans., 17, 230-231 (1989)）するなどの物理吸着で固定する方法、  
などが知られている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記のような従来方法には難点のあることが指摘されていた。例えば、化学結合による方法では、特殊試薬が必要でそれらの中には例えばアジド、イソシアナートや  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  などのような有毒物質が含まれるばかりか、例えばペプチド結合を介して固定化しようとする場合は、活性物質あるいは基材のどちらか一方にアミノ基を、残る片方にはカルボキシル基を導入する必要があり、さらに、導入された官能基同士を縮合試薬で処理して固定化

する工程を経なければならないというように、操作が複雑となることを避けられない。

【0011】また化学結合では、例えばグルタルアルデヒドを架橋剤として使用するには、基材と活性物質の双方にアミノ基が存在せねばならないというように、基材自体に官能基が必要なために基材の選択が必要となる結果、固定に適した基材の選択が困難になり、加えて、たとえば天然の DNA や修飾基を持たない合成 DNA などの反応性の乏しい官能基（末端リン酸基、末端ヒドロキシル基等）しか有しないものについては化学反応による方法を用いることが困難であるというように、活性物質に活性官能基が無い場合は固定できないという難点がある。

【0012】一方、物理吸着には、基材の吸着性能に固定化量が左右されたり、吸着した活性物質が脱離しやすく、活性物質が低分子（オリゴマー）の場合、基材との相互作用が弱いため、吸着しにくいという難点がある。

【0013】以上のようにタンパク質、核酸などの活性物質の検出において重要な固定化には多くの問題点を残している。本発明は、簡便、効率的にかつ強固に生物学的に活性な物質を固定できるカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる材料を用いて、生物学的に活性な化合物を検出する方法を提供するためになされたものである。

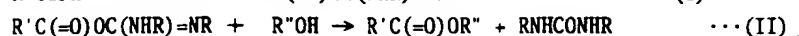
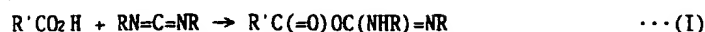
【0014】

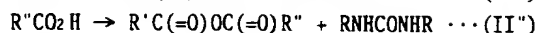
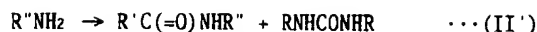
【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために本発明が採用した生物学的に活性な物質を固定するための材料の構成は、基材と、該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなることを特徴とするものであり、上記目標を達成するために本発明が採用した生物学的に活性な物質を固定するための方法の構成は、基材および該基材上に担持されたカルボジイミド基を有する高分子化合物よりなる固定用の材料と、カルボジイミド基との反応性を有する生物学的に活性な物質を接触させることを特徴とするものである。

【0015】低分子カルボジイミド誘導体、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドやジ-*p*-トルオイルカルボジイミドは、エステルおよびペプチドなどの合成における脱水縮合剤として従来より広く使用されていて、これらカルボジイミド誘導体は、以下の反応式に示すように容易にカルボン酸と付加体を形成し（一般式 (I)）、さらにこの付加体がアルコール、アミン、カルボン酸等と尿素誘導体を放出しつつ縮合し、それぞれ相当するエステル、アミド、酸無水物を生成する（一般式 (II)）ので、このような低分子カルボジイミド誘導体を活性物質の固定に使用することも考えられた。

【0016】

【化 1】





【0017】しかしながら、これら低分子カルボジイミド誘導体は、縮合剤として開発されてきた試薬であって、溶剤に対する溶解性が付与されており、基材に適用し、該基材表面に担持させる使用目的に関しては、脱離しやすく、実用上使用できないことが判明した。そこで、本発明の発明者らは、カルボジイミド基を分子内に含む高分子量カルボジイミド化合物に着目し、鋭意研究を続けた結果、このようなカルボジイミド化合物が、活性物質との反応性を有しているばかりでなく、様々な種類の基材との接着性がよく、固定した物質を利用する種々の生物学的に重要な化合物の検出に適用できることを見だし本発明の完成に至った。

【0018】すなわち本発明は、担体に固定化された生物学的に活性な第1の物質と、この第1の物質に特異的に結合し得る第2の物質とを反応させ、前記第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、試料中の第1の物質又は第2の物質を分析する方法において、前記担体はカルボジイミド基を2～100個有する化合物を含み、前記第1の物質はカルボジイミド基を介して担体に固定化されることを特徴とする、生物学的に活性な物質の分析法である。

【0019】以下に本発明を詳細に説明する。

【0020】<1>担体

本発明に用いられる担体は、生物学的に活性な物質を固相化するためのものであり、カルボジイミド基を有する高分子化合物を含む。通常は、基剤にカルボジイミド基を有する高分子化合物を担持させたものである。

【0021】(1)基剤

本発明で使用される基材としては、生物学的に活性な物質を固定化するための支持体としての役割を果たすものであって、基本的には、水あるいは溶剤またはそのどちらにも不溶性であり、かつ常温もしくはその付近の温度範囲内(0～100℃)で固体又はゲル状であるもの、たとえば、プラスチック、無機高分子、金属、天然高分子、セラミックが挙げられる。

【0022】プラスチックとして具体的には、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化エチレン、ポリイミドおよびアクリル樹脂などが、無機高分子としては、ガラス、水晶、カーボン、シリカゲル、およびグラファイト等が、金属としては、金、白金、銀、銅、鉄、アルミニウム、磁石、パラマグネットおよびアバタイト等の常温固体金属が、天然高分子としては、セルロース、セルロース誘導体、キチン、キトサン、アルギン酸およびアルギン酸塩等が、セラミックとしては、アルミナ、シリカ、炭化ケイ

素、窒化ケイ素および炭化ホウ素などを例示することが出来る。

【0023】上記基材の形状としては、たとえば、フィルム、平板、粒子、成型品(ビーズ、ストリップ、マルチウエルプレートのウエルまたはストリップ、チューブ、メッシュ、連続発砲フォーム、膜、紙、針、ファイバー、プレート、スライドおよび細胞培養容器)、ラテックスを挙げることが出来、またその大きさについては、当然であるが特に制限はない。

【0024】(2)カルボジイミド基を有する高分子化合物

一方、本発明で使用するカルボジイミド基を有する高分子化合物(以下、単に「カルボジイミド化合物」ということがある)としては、例えば、特開昭51-61599号公報に開示されている方法や L. M. Alberino らの方法(J. Appl. Polym. Sci., 21, 190 (1990)あるいは特開平2-292316号公報に開示されている方法などによって製造することができるポリカルボジイミドを挙げることができる。すなわち、有機ポリイソシアネート化合物からイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒(例えば3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド)の存在下に製造することができるものである。

【0025】上記の有機ポリイソシアネート化合物としては、例えば、4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート、m-тетраметилкисилренジイソシアネート、2, 4-トリレンジイソシアネート、2, 6-トリレンジイソシアネート、2, 4-トリレンジイソシアネートと2, 6-トリレンジイソシアネートの混合物、粗トリレンジイソシアネート、粗メチレンジフェニルジイソシアネート、4, 4', 4''-トリフェニルメチレントリイソシアネート、キシレンジイソシアネート、ヘキサメチレン-1, 6-ジイソシアネート、リジンジイソシアネート、水添メチレンジフェニルジイソシアネート、m-フェニルジイソシアネート、ナフチレン-1, 5-ジイソシアネート、4, 4'-ビフェニレンジイソシアネート、4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート、3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ビフェニルジイソシアネート、3, 3'-ジメチルジフェニルメタン-4, 4'-ジイソシアネート、イソホロンジイソシアネートやこれらの任意の混合物を挙げることができる。

【0026】上記ポリイソシアネート化合物又はそれらの混合物のイソシアネート基をカルボジイミド化することによって重縮合が起こる。その際、適当な段階でモノイソシアネートの一種または2種以上を適量加え、カルボジイミド化合物の末端を封止することにより、分子量(重合度)を調整することができる。また、モノイソ

シアネートは、重縮合反応の初めから適量加えてもよい。このようなモノイソシアネートとしては、フェニルイソシアネート、(オルト、メタ、パラ)トリルイソシアネート、ジメチルフェニルイソシアネート、n-ブチルイソシアネート、シクロヘキシルイソシアネート、メチルイソシアネート等を例示することができる。重合度は、ポリイソシアネート化合物等の濃度や反応時間によっても調整することができる。

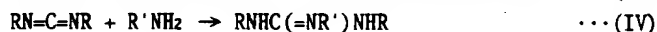
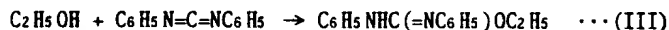
【0027】又、容易に類推されることであるが、この他にも末端封止剤としては、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-SH$ 、 $-NH$ 等の官能基を末端に有するアルキル基を有する化合物約1モルと、芳香族ジイソシアネート2モルとの反応によって簡便に製造できるイソシアネート末端化合物から誘導されるものでもよい。

【0028】上記有機イソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒としては、種々のものを例示することができるが、1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド、3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド、1-エチル-2-ホスホレン-1-オキシドやこれらの3-ホスホレン異性体などが収率その他の面で好適である。

【0029】上記ポリカルボジイミドの製造は、無溶媒又は非反応性の有機溶媒中で行うものであり、本発明ではこれらにより製造したワニス状あるいは固体状(粉末)のポリカルボジイミドの一種又は混合物をカルボジイミド化合物の一例として用いることができる。なお、これらのポリカルボジイミドは、基材との結合性を増加させるために、部分的に架橋するようにしてもよい。

【0030】他のカルボジイミド化合物、例えば特開昭63-172718号公報及び特開昭63-264128号公報に記載されるような、分子構造内にポリオキシエチレン鎖を付加して成る親水性を付与されたタイプのカルボジイミド化合物も本発明で使用する事ができる。

【0031】いずれのタイプであっても、本発明で使用



#### 【0035】(3) 担体の調製

本発明に用いる生物学的に活性な物質を固相化するための担体は、上記基剤と、該基材上に担持された、上記カルボジイミド化合物よりなる。該カルボジイミド化合物の前記基材に対する高い接着性を利用して、基剤にカルボジイミド化合物を担持させたものである。なお、ここでいう「担持」とは、水あるいは溶媒中で、基剤からカルボジイミド化合物が脱離しないことを意味する。

【0036】カルボジイミド化合物は、必要に応じ、基材上の全面において担持されても、また、その一部において担持されてもよく、その代表的な形態は皮膜である。前記基材上に前記カルボジイミド化合物を担持させる方法としては、スプレー、浸漬、ブラッシング、スタ

するカルボジイミド高分子化合物は、その分子中に2以上100以下のカルボジイミド基を有しているものが好ましく、このカルボジイミド高分子化合物においてカルボジイミド基の数が2未満、すなわち1の場合は生物学的に活性な物質を固定する能力に欠け、また逆にカルボジイミド基の数が101以上の場合には性能面では問題はないが、粘度が高すぎたり、溶液とすることが出来ない場合があり、基材上に担持させる際の取り扱い性が悪化することがある。

【0032】また、本発明で使用するカルボジイミド高分子化合物の分子量の範囲としては、1000以上であり、100000以下であることが好ましい。なお、たとえば、前記有機ポリイソシアネート化合物からイソシアネートのカルボジイミド化を促進する触媒の存在下に製造されたポリカルボジイミドの中には、分子量が1000に満たないものも存在するが、このようなポリカルボジイミドについては、ポリカルボジイミドの両末端に、ウレア結合またはウレタン結合を介して、ポリアルキレン、ポリオキシアルキレン、ポリウレタン、ポリアミドなどを導入し、分子量を前記範囲に調整すればよい。

【0033】すでに説明したように、上記カルボジイミド高分子化合物におけるカルボジイミド基の反応性は高く、アルコール、アミン、チオール、フェノール、カルボン酸等の有するほとんどの活性水素基と反応するのであり、前記カルボジイミド誘導体とカルボン酸との反応以外の反応を示せば、例えば、アルコールとは、下記(I II)式のように進行し、アミノ基とは(IV)式のように進行する(Frederick Kurzer, K. Douraghi-Zadeh, Chemical Reviews, 67, 117-135, (1967) および Andrew Williams, Ibrahim T. Ibrahim, Chemical Reviews, 81, 599-606, (1981)参照)ので、本発明は、このような反応性を利用して活性物質を基剤に固定するのである。

【0034】

【化2】

ンプ、蒸着、フィルムコーターを用いたコーティング等の公知の手段を採用することができる。

【0037】このようにして得られた本発明の活性物質を固相化するための担体は、カルボジイミド化合物の反応性を利用して、様々な活性物質を固定することができるものである。

#### 【0038】<2>生物学的に活性な物質

担体に固定化する生物学的に活性な第1の物質としては、タンパク質、ペプチド若しくはその他の抗体結合性物質、核酸などの生体高分子等を挙げることができる。

【0039】具体的には、タンパク質、ペプチドとしては、インシュリン、ACTH(副腎皮質刺激ホルモン)、オキシトシン等のタンパク質ホルモンもしくはペ

ブチドホルモン、コリンエステラーゼ、アミラーゼ、ペプシン等の酵素又はその前駆体、HBs抗原、HIV抗原等のタンパク質抗原、プロテインAのような抗体結合性タンパク質などが、抗体結合性物質としては低分子量のハプテンが、核酸としては天然又は合成のDNA（オリゴヌクレオチドを含む）もしくはRNA（オリゴヌクレオチドを含む）が挙げられる。

【0040】具体的には、次のような化合物を例示できる。抗菌性を有する生理活性物質、例えばペニシリン、アンピシリン、セファロスポリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、フラジオマイシン、デストマイシン、カスガマイシン、タイロシン、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、スピラマイシン、リンコマイシン、コリスチン、バシトラシン、サリノマイシン、モネンシン、ラサロシド、テトラサイクリンおよびその類縁物質、クロラムフェニコール、バジニアマイシンなど。合成抗菌剤としてはサルファ剤、オキシリン酸、ピロミド酸、フラゾリドン、ジフラゾンなどが挙げられ、天然毒素全般としてはアフラトキシン、T2トキシン、ゼアラレノン、デオキシニバレノール、パツリン、フモニシン、HT-2、オクラトキシン、テトロドトキシン、オカダ酸、サキシトシン、ゴニオトキシン、ボツリヌス毒素などが挙げられ、合成化学品としては農薬全般、例えばダイオキシン、2,4-D、ベミノル、アルディカルブ、カルボフラン、メソミル、DDVP、マラソン、バラコート、ダイアジノン、フェントロチオン、エンドリン、アルドリノ、ヘプタクロルなどが挙げられる。また、生体化学物質全般としてはヘモグロビン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、免疫グロブリン、アルブミン、アンチトロンビン、トロンビン、プラスミノゲン、フェリチン、チログロブリン、ゼラチン、コレステロール、テストステロン、コルチコステロン、プロゲステロン、エルゴステロール、エストラジオール、チトクロムC、アドレナリン、各種ビタミン等が挙げられる。

【0041】さらに、上記タンパク質、ペプチド、その他の生物学的に活性な物質に結合し得る抗体が挙げられる。該抗体は、例えば上述の物質又は免疫用担体との複合物を、免疫動物例えばラット、モルモット、ウサギ、マウス、ヤギ、ヒツジ、馬、牛などの哺乳類に免疫して得るか、マウスに免疫後そのリンパ球とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体として得られる。

【0042】一方、生物学的に活性な第2の物質は、上記のような第1の物質と同様のタンパク質、ペプチド、抗原性物質、核酸、その他の生理活性物質であって、第1の物質に特異的に結合するものである。すなわち、例えば、第1の物質と第2の物質の一方がタンパク質、核酸又はその他の生理活性物質である場合には、他方はそれに対する抗体であり、一方の物質が核酸である場合には、他方はその核酸の塩基配列に実質的に相補的な塩基

配列を有する核酸である。ここで実質的に相補的とは、1又は2以上のミスマッチがあっても、各々の核酸が水素結合によってハイブリダイズし、2本鎖を形成することができることをいう。

【0043】尚、分析対象は、第1の物質であっても、第2の物質であってもよい。

【0044】＜4＞生物学的に活性な物質の分析  
本発明による生物学的に活性な物質の分析法は、上記のような生物学的に活性な第1の物質を前記担体に結合させ、これと第2の物質とを反応させ、第1の物質と第2の物質との結合を介して担体に間接的に結合した第2の物質又は結合しない第2の物質を検出することにより、行われる。

【0045】第1の物質を担体に固定するには、当該材料と活性物質とを接触させれば良く、担体に担持されたカルボジイミド高分子化合物のカルボジイミド基と、第1の物質が有する水酸基、アミノ基、チオール基、カルボキシル基等との反応により、第1の物質はカルボジイミド高分子化合物と共有結合する。その結果、第1の物質は担体に固定化される。

【0046】第1の物質と担体との接触は、第1の物質の生物学的活性が維持されるように、水あるいはバッファ中で行うことが好ましく、また、接触の際の温度としては、やはり活性物質の活性が損なわれないように、0～100℃とすることが好ましい。

【0047】尚、担体へ第2の物質等が非特異的に結合することを防ぐために、第1の物質を担体に固定化した後に、過剰量のウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、サケ精子DNA等を担体に接触させ、フリーのカルボジイミド基をブロックしておくことが好ましい。

【0048】このようにして得られた固相化された生物学的活性物質は、該物質が担体に対して非常に強固に固定されたものであり、イムノアッセイの分野で広く使われている洗浄法（例えば界面活性剤を用いた洗浄法）によっても担体から脱離することがなく、抗体あるいは抗原を固定した担体の免疫学的利用、核酸固定担体の診断薬としての利用分野を有している。

【0049】担体に固定化された第1の物質と第2の物質とを反応させた後、担体に結合した第2の物質を検出するには、通常の固相のイムノアッセイ、核酸のハイブリダイゼーション法と同様に行えばよい。例えば、第1の物質が測定対象である場合には、標識物質で標識しておいた第2の物質を固定化された第1の物質と反応させ、担体に固定化された標識物質を検出又は定量することにより、結合した第2の物質を検出又は定量することができる。その結果、第1の物質を検出又は定量することができる。第1の物質に結合した第2の物質のかわりに、結合しなかつた第2の物質を検出、定量してもよい。

【0050】また、第2の物質が測定対象である場合に

は、第1の物質と第2の物質とを反応させる際に、反応系に標識物質で標識された第2の物質をさらに加え、第1の物質に結合した標識された第2の物質の結合量により、間接的に試料中の第2の物質の量を定量することができる(阻害法)。

【0051】さらに、担体に結合した第2の物質の検出は、第2の物質に特異的に結合し得る、第3の物質を反応させることによっても行うことができる。例えば、第2の物質が抗原であり、第1の物質がこの抗原に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体(第1抗体)である場合、担体-抗体-抗原複合体に、ポリクローナル抗体又は前記モノクローナル抗体とエビドープが異なる他のモノクローナル抗体(第2抗体)を反応させ、担体-抗体-抗原-抗体複合体を形成させ、複合体中の第3の物質を検出することにより、第2の物質を検出することができる(サンドイッチ法)。このとき、第3の物質が標識されている場合にはその標識を検出すればよく、標識されていない場合であっても、さらに第3の物質に結合する物質を用い、これを標識しておいてもよい。例えば、上記の例では第1抗体と第2抗体とを別の動物で調製し、第2抗体の調製に用いた動物のイムノグロブリンに対する抗体を第3の物質とする。また、核酸の場合も同様に、担体に固定化した第1の核酸にこれに特異性を有する第2の核酸を結合させ、さらに第2の核酸に特異性を有し第1の核酸に特異性を有しない第3の核酸を結合させ、担体に結合した第3の核酸の量から第2の核酸を定量することができる。

【0052】また乳濁状の担体を用いて、一般的な凝集法により、第2の物質を検出することもできる。標識物質としては、放射性物質、蛍光物質、酵素、色素、化学発光物質、ジゴキシゲニン等が挙げられる。放射性物質、蛍光物質、色素で標識した場合には、標識はシンチレーションカウンターによる測定、フィルムへの露光あるいは肉眼観察により、直接検出することができる。酵素を用いた場合には、酵素反応により発色する基質色素を用い、その発色を検出すればよい。このような酵素は、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、リゾチームなど一般的に用いられるものでよい。

【0053】また、必ずしも標識物質自体が検出することができないものであってもよい。例えば標識物質としてビオチンを用いた場合には、これに特異的に結合するアビジン又はストレプトアビジンを結合させた酵素等を用いることにより、間接的に検出することができる。

【0054】第1の物質と第2の物質、さらに必要に応じて第3の物質又はその他の物質を反応させた後に未反応の物質を除去、すなわちB/F分離するには、通常の固相イムノアッセイ、ハイブリダイゼーション法と同様に行えばよい。すなわち、担体が容器状である場合には、担体に洗浄液を満したのち、洗浄液を捨てるとい

う操作を度繰り返す。担体が粒子である場合には、洗浄液に担体を懸濁する操作を繰り返せばよい。

【0055】

【実施例】以下実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

【0056】

【製造例1】カルボジイミド化合物溶液の製造(1)

4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート117.9gとシクロヘキシルイソシアネート12.5gをカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド)1.3gと共に窒素雰囲気下、180℃で4日間反応させ、室温で粉末状のカルボジイミド化合物(重合度10、数平均分子量2400)を得た。これを10g取りメタノール100mlに溶解させ、カルボジイミド化合物溶液1を得た。

【0057】

【製造例2】カルボジイミド化合物溶液の製造(2)

イソホロンジイソシアネート19.9gとn-ブチルイソシアネート2.0gをカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド)0.2gと共に窒素雰囲気下、180℃で3日間反応させ、室温で粉末状のカルボジイミド化合物(重合度10、数平均分子量1900)を得た。これを10g取りジクロロメタン100mlに溶解し、カルボジイミド化合物溶液2を得た。

【0058】

【製造例3】カルボジイミド化合物溶液の製造(3)

2, 4-トリレンジイソシアネート/2, 6-トリレンジイソシアネート混合物(混合割合=80:20)78.4gとフェニルイソシアネート11.9gとをテトラクロロエチレン615g中で、カルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)0.9gと共に窒素雰囲気下、75℃で24時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液3(重合度10、数平均分子量1500)を得た。

【0059】

【製造例4】カルボジイミド化合物溶液の製造(4)

4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート112.6gとフェニルイソシアネート11.9gとをテトラヒドロフラン922.7g中でカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)1.2gと共に窒素雰囲気下、75℃で16時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液4(重合度10、数平均分子量2300)を得た。

【0060】

【製造例5】カルボジイミド化合物溶液の製造(5)

m-テトラメチルキシリレンジイソシアネート700gとカルボジイミド化触媒(3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド)14gを窒素雰囲気下、180℃で12時間反応させ、イソシアネート末端テトラメ

テルキシリレンカルボジイミド (重合度=3) を得た。次いで、得られたカルボジイミド 74.6 g と重合度 6 のポリ (オキシエチレン) モノメチルエーテル 63.6 g を 100℃ で 48 時間反応させた。これを 10 g 取り、50℃ で蒸留水 90 g を徐々に加えることでカルボジイミド化合物溶液 5 (数平均分子量 1400) を得た。

#### 【0061】

##### 【製造例 6】カルボジイミド化合物溶液の製造 (6)

4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート 162 g をテトラヒドロフラン 886 g 中でカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド) 0.33 g と共に窒素雰囲気下、還流下で 7 時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液 6 (重合度 60、数平均分子量 13000、ポリマー濃度 15 重量%) を得た。

#### 【0062】

##### 【製造例 7】カルボジイミド化合物溶液の製造 (7)

m-テトラメチルキシリレンジイソシアネート 700 g とカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド) 14 g を窒素雰囲気下、180℃ で 18 時間反応させ、イソシアネート末端テトラメチルキシリレンカルボジイミド (重合度=4) を得た。次いで、得られたカルボジイミド 50.2 g と 2-ジメチルアミノエタノール 8.9 g を 80℃ で 24 時間反応させた後、p-トルエンスルホン酸メチル 18.6 g を加え 1 時間反応させた。これに蒸留水 699.3 g を徐々に加えることでカルボジイミド化合物溶液 7 (数平均分子量 1600、ポリマー濃度 10 重量%) を得た。

#### 【0063】

##### 【製造例 8】カルボジイミド化合物溶液の製造 (8)

イソホロンジイソシアネート 20 g とカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド) 0.2 g を窒素雰囲気下、180℃ で 18 時間反応させ、イソシアネート末端イソホロンカルボジイミド (重合度=4) を得た。次いで、得られたカルボジイミド 7.56 g と 3-ジメチルアミノプロピルアミン 2.04 g を 80℃ で 1 時間反応させた後、p-トルエンスルホン酸メチル 3.72 g を加え 1 時間反応させた。これに蒸留水 120 g を徐々に加えることでカルボジイミド化合物溶液 8 (数平均分子量 1400、ポリマー濃度 10 重量%) を得た。

#### 【0064】

##### 【製造例 9】カルボジイミド化合物溶液の製造 (9)

4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート 117.9 g とカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド) 1.2 g を窒素雰囲気下、180℃ で 8 時間反応させ、イソシアネート末端ジシクロヘキシルカルボジイミド (平均重合度=2.4) を得た。次いで、得られたカルボジイミド

7.85 g と重合度約 6 のポリ (オキシエチレン) モノメチルエーテル 5.92 g を 100℃ で 48 時間反応させた。これに蒸留水 124 g を徐々に加えることでカルボジイミド化合物溶液 9 (数平均分子量 1300、ポリマー濃度 10 重量%) を得た。

#### 【0065】

##### 【製造例 10】カルボジイミド化合物溶液の製造 (10)

4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート 15 g とカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン-1-オキシド) 0.1 g をテトラヒドロフラン 145 g 中、窒素雰囲気下、75℃ で 8 時間反応させ、イソシアネート末端ジフェニルメタンカルボジイミド (重合度=5) を得た。次いで、得られたカルボジイミド溶液に重合度約 10 のポリ (オキシエチレン) モノメチルエーテル 9.44 g を加え、75℃ で 48 時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液 10 (数平均分子量 2100、ポリマー濃度 10 重量%) を得た。

#### 【0066】

##### 【製造例 11】カルボジイミド化合物溶液の製造 (11)

2, 4-トリレンジイソシアネート/2, 6-トリレンジイソシアネートの混合物 (混合割合=80:20) 13.9 g とカルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド) 0.1 g をテトラヒドロフラン 150 g 中、窒素雰囲気下、75℃ で 8 時間反応させ、イソシアネート末端トリレンカルボジイミド (重合度=4) を得た。次いで、得られたカルボジイミド溶液にヒドロキシプロパンスルホン酸ナトリウム 1.62 g を加え、75℃ で 24 時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液 11 (数平均分子量 1000、ポリマー濃度 10 重量%) を得た。

#### 【0067】

##### 【製造例 12】カルボジイミド化合物溶液の製造 (12)

4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネート 24 g と平均分子量 400 のポリエチレングリコール 20 g をテトラヒドロフラン 440 g に加え反応させた。次に、カルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニルホスホレン-1-オキシド) 0.2 g を、窒素雰囲気下、75℃ で 48 時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液 12 (数平均分子量 5300、ポリマー濃度 10 重量%) を得た。

#### 【0068】

##### 【製造例 13】カルボジイミド化合物溶液の製造 (13)

4, 4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート 52.4 g と 1, 4-ジアミノブタン 8.8 g をテトラヒドロフラン 620 g に加え反応させた。次に、カルボジイミド化触媒 (3-メチル-1-フェニルホスホレン-



1-オキシド) 0.5 gを、窒素雰囲気下、75°Cで48時間反応させ、カルボジイミド化合物溶液13 (数平均分子量3700、ポリマー濃度10重量%)を得た。

【0069】

【実施例1】カルボコートマイクロプレートに固定したDNAの標識DNAによる検出

(1) マイクロプレート上へのDNAオリゴマーの固定  
DNA合成機 (ミリボア社製、サイクロンプラス DNA/RNAシンセサイザー) によりキャプチャーDNAオリゴマー (配列番号1) 及びビオチン化プローブDNAオリゴマー (配列番号2) を合成した。プローブは、DNAオリゴマー合成の際にビオチンフォスフォルアミダイト (ミリボア社製) を用いて、ビオチンを5'末端に導入した。

【0070】ポリスチレン製の96穴マイクロプレートの各ウェルにカルボジイミド化合物溶液1を0.1mlずつ分注し、60°Cで1時間インキュベートした。溶液を抜き取った後、各ウェルをエタノールでよく洗浄した。60°Cで30分乾燥した後各ウェルにキャプチャー30mer水溶液 (10 pmol/100 µl) を100 µl加えプレートをシールをした。37°Cのインキュベーター中で1時間固定化させた。

【0071】一方、コントロールとして上記プローブと全く相補性を示さないオリゴヌクレオチド (配列番号3) も同様に固定化した。

【0072】(2) ハイブリダイゼーションによるキャプチャーオリゴヌクレオチドの検出

キャプチャーオリゴヌクレオチド (配列番号1) 又はコントロールDNAオリゴマーを固定したプレートにプレハイブリダイゼーション溶液 (100 µl/ウェル) を加えプレートをシールをし、42°Cのインキュベーター中で2時間放置した。プレハイブリダイゼーション溶液の組成は、5×SSC (0.75M NaCl, 0.075M クエン酸ナトリウム)、5×Denhardt's solution (0.02% フィコール, 0.02% BSAフラクションV, 0.02% ポリビニルピロリドン)、25mM リン酸ナトリウム (pH 6.6)、50%フォルムアミド、0.5mg/ml 変性サケ精子DNAである。

【0073】各ウェルの溶液をディスペンサーで吸い取り、プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液 (100 µl/ウェル) を加えプレートをシールをした。42°Cのインキュベーター中で15時間反応させた。ハイブリダイゼーション溶液の組成は、5×SSC、1×Denhardt's solution、25mMリン酸ナトリウム (pH 6.6)、45%フォルムアミド、0.2mg/ml 変性サケ精子DNA、10%デキストラン硫酸である。

【0074】プローブは、1, 10, 100 pmol/ウェルになるように70°C、5分間処理後、水中で5分

間急冷し、ハイブリダイゼーション溶液に加えた。ハイブリダイゼーション後、ウェルの溶液を吸い取り1×SSC (300 µl/ウェル) を加え、室温下で5分間放置した。この操作をあと2回行い非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0075】(3) 検出

ウェル中のSSCを吸い取り、3%BSAを含む緩衝液A (0.2M塩化ナトリウム、0.1Mトリス塩酸, pH 7.5, 0.05%トライトンX-100) を300 µl/ウェル加え、室温下30分間ブロッキングを行なった。ウェル中の溶液を吸い取り、ストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液 (ギブコBRL社製、緩衝液Aで原液を5000倍希釈したもの) を100 µl/ウェル加え、室温下30分間反応させた。コンジュゲート溶液を吸い取り、緩衝液Aを300 µl/ウェル加え、室温下5分間放置した。この操作をあと2回行い、ビオチンと結合しなかったコンジュゲートを除去した。pNpp溶液を100 µl/ウェル加え、30°C30分間反応させた。pNpp溶液の組成は、50mM 四ほう酸ナトリウム (pH 10.0)、5mM塩化マグネシウム、5mM p-ニトロフェニルリン酸2ナトリウムである。

【0076】反応後、0.1N水酸化ナトリウム水溶液を加えて酵素反応を停止させた。マイクロプレートリーダーで各ウェルの405nmの吸収を計測した。計測の結果、相補性のないオリゴマー (配列番号3) を固定したプレートの吸収値はバックグラウンドに等しく、キャプチャーを固定したプレートではバックグラウンドと有意な差を示す吸収値を得た。表1に結果を示す。

【0077】

【表1】

表1

キャプチャーDNA	吸収値 (A <sub>405</sub> )
配列番号1	1.54
配列番号3	0.05

(バックグラウンド0.05)

【0078】

【実施例2】カルボコートポリスチレンビーズに固定したM13DNAの標識M13DNAによる検出

(1) ビーズ上へのキャプチャーDNA固定  
ポリスチレンビーズ5gをカルボジイミド化合物溶液2 (100ml) に30分間浸漬した後、60°Cで3時間乾燥し、カルボジイミド被膜ビーズを得た。

【0079】カルボジイミド被膜ビーズ1gを滅菌蒸留水10mlに懸濁した。この懸濁液中に熱変性させたM13RF DNA又はpBR322 DNAを100 ng/mlになるように加え、振盪させながら37°Cで2時間

固定化させた。ビーズをフィルターを用いて蒸留水500mlで洗浄し、風乾させた。

#### 【0080】(2) ハイブリダイゼーション

風乾したビーズ100mgを1.5ml容ディスポーザブルチューブに秤取り、実施例1で用いたプレハイブリダイゼーション溶液を1ml加え、42℃中で2時間放置した。遠心操作によりビーズを分離し、実施例1のハイブリダイゼーション溶液を1ml加えよく懸濁させた。あと2回同一の操作を行なった。ハイブリダイゼーション溶液1mlを加え、ビーズをよく懸濁させた。フォトビオチン(VECTOR社製)を用いてビオチン標識したM13 ssDNAを熱変性後1μg/mlになるように加えた(尚、コントロールとして同標識方法でビオチンを導入したpBR322を用いた。)。42℃で振盪させながら、15時間反応させた。

【0081】遠心操作によりビーズを分離し、上清を除去し2×SSCを1ml加えてよく懸濁させ、5分間室温下放置した。この操作をあと2回繰り返した。遠心操作により上清を除去し、0.2×SSC1mlを加えビーズをよく懸濁させ、室温下5分間放置した。この操作をあと2回行なった。遠心操作によって上清を除去し、50℃に予め温めた0.16×SSCを1ml加えよく懸濁させ、50℃で10分間放置した。この操作をあと1回行なった。

【0082】上清を遠心操作によって除去し、実施例1の3%BSAを含む緩衝液Aを1ml加え、振盪させながら室温下30分間放置した。遠心操作により上清を除去し、緩衝液Aで1000倍希釈したストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼ(ギブコBRL社製)を1ml加え、ビーズをよく懸濁させ室温下30分間振盪させながら放置した。遠心操作により上清を除去したのち、緩衝液Aを1ml加えてビーズをよく懸濁させ室温下5分間放置した。あと2回同操作を行なった。

【0083】遠心操作により上清を除去し、ほう酸緩衝液(50mM四ほう酸ナトリウム、pH10.0、5mM塩化マグネシウム)を1ml加え、ビーズを懸濁させた。この操作をあと2回行なった。遠心操作により上清を除去し実施例1のpNpp溶液を400μl加え、ビーズをよく懸濁させた。30℃で30分間反応させた後0.1N水酸化ナトリウム水溶液を800μl加え、反応を停止させた。吸光光度計を用いて405nmの吸収を測定した。

【0084】その結果pBR322を固定したビーズには吸収が認められず、M13DNAを固定したビーズにはバックグラウンドと有意な差を示す値が得られた。表2に結果を示す。

#### 【0085】

#### 【表2】

表2

プローブDNA	吸収値 (A <sub>405</sub> )
M13 ssDNA	0.96
pBR322 DNA	0.05

(バックグラウンド0.05)

#### 【0086】

【実施例3】カルボコート変性セルロースメンブレンに固定したDNAオリゴマーの標識M13DNAによる検出

#### (1) DNAオリゴマーの固定

変性セルロースフィルターをカルボジイミド溶液3に10秒間浸した後、60℃で30分間乾燥させた。このフィルターを濾紙上に置き、実施例1と同様にして合成したM13DNAのマルチクローニングサイトと相補的な配列を有するDNAオリゴマー(40mer)(配列番号4)の水溶液とM13DNAと相補性を示さないDNAオリゴマー(40mer)(配列番号5)の水溶液をそれぞれ1ngから10fgまでの10段階希釈溶液を1μlずつスポットした。37℃中で15分間放置し、DNAオリゴマーを固定化させた。

#### 【0087】(2) ハイブリダイゼーション

オリゴマーを固定化させたカルボコート変性セルロースメンブレンをハイブリダイゼーションバッグ(ベセスダ・リサーチ・ラボラトリー製)に入れ、実施例1のプレハイブリダイゼーション溶液を加えて(0.08ml/cm<sup>2</sup>メンブレン)、ヒートシーラーで封入した。42℃中で2時間放置した。ハイブリダイゼーションバッグからメンブレンを取り出し、新しいハイブリダイゼーションバッグに入れた。このバッグに熱変性したフォトビオチン(VECTOR社製)でビオチン標識したM13RF DNA(100ng/ml)を含む実施例1のハイブリダイゼーション溶液を加え(0.03ml/cm<sup>2</sup>)、ヒートシーラーで封入し、42℃で15時間置いた。ハイブリダイゼーションバッグからメンブレンを取り出し、メンブレンが充分浸る量の2×SSCが入ったトレイに入れた。ゆっくりと室温下で5分間振盪させた。この操作を再度行なった。次に40℃に予め温めた充分量の0.2×SSCの入ったトレイにメンブレンを入れ、40℃でゆっくりと5分間振盪させた。この操作をあと2回行なった。2×SSCの入ったトレイにメンブレンを移し、よく洗浄した。

#### 【0088】(3) 検出

新しいハイブリダイゼーションバッグにメンブレンを入れ、3%BSAを含む緩衝液Aを加えて(1ml/cm<sup>2</sup>)ヒートシーラーで封入した。室温下で30分間置いた。ハイブリダイゼーションバッグからメンブレンを取り出し新しいハイブリダイゼーションバッグに移しスト

レプトアビジン-アルカリフォスファターゼコンジュゲート溶液（ギブコBRL社製、緩衝液Aで1000倍に希釈したもの）を加え（ $0.1\text{ ml/cm}^2$ ）、ヒートシーラーで封入し、室温下で30分間放置した。ハイブリダイゼーションバッグからメンブレンを取り出し、充分量の緩衝液Aの入ったトレイに移し、室温下で5分間振盪しながら洗浄した。この操作をあと2回行なった。

【0089】新しいハイブリダイゼーションバッグにメンブレンを入れ、発色基質溶液を加え（ $0.1\text{ ml/cm}^2$ ）ヒートシーラーで封入した。室温下で適度のシグナルが得られるまで放置した。発色基質の組成は、 $0.1\text{ M}$  トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH } 9.5$ 、 $0.1\text{ M}$   $\text{NaCl}$ 、 $50\text{ mM}$  塩化マグネシウムの溶液  $1\text{ ml}$  にBCIP

溶液（ $50\text{ mg}$  5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート/ $900\text{ ml}$  ジメチルホルムアミド） $3.2\text{ }\mu\text{l}$  とNBT溶液（ $50\text{ mg}$  ニトロブルーテトラゾリウム/ $1.8\text{ ml}$   $70\%$  エタノール） $6.4\text{ }\mu\text{l}$  を加えたものである。

【0090】十分なシグナルが得られた後、メンブレンを $0.2\text{ M}$  EDTA緩衝液（ $\text{pH } 8.0$ ）で洗浄し発色反応を停止させた。その結果、M13 DNAに相補性を持つオリゴマーを固定した位置にのみシグナルを得た。結果を表3に示す。

【0091】

【表3】

表3

固定したDNAオリゴマー	シグナル					
配列番号4	○	○	○	○	△	×
配列番号5	×	×	×	×	×	×
オリゴマー使用量	$1\text{ ng}$	$100\text{ pg}$	$10\text{ pg}$	$1\text{ pg}$	$100\text{ fg}$	$10\text{ fg}$

○：はっきり見える △：見える ×：見えない

【0092】

【実施例4】カルボコートマイクロプレートに固定したDNAオリゴマーの2段階のハイブリダイゼーションによる検出

(1) DNAオリゴマーの固定

実施例1に従ってM13 ssDNAに相補的なキャプチャーDNAオリゴマー（40mer）（配列番号4）を固定化させた。

【0093】(2) ハイブリダイゼーション

各ウェルに $100\text{ }\mu\text{l}$ のプレハイブリダイゼーションを加え、プレートをシールをして $42^\circ\text{C}$ 中で2時間置いた。各ウェルの溶液をディスペンサーで吸い取り、熱変性させたM13 ssDNAを $100\text{ ng/ml}$ （コントロールの系にはpBR322を加えた）と、実施例1と同様の方法で合成し5'末端をビオチン標識し、熱変性させたM13 ssDNAと相補的なビオチン化DNAオリゴマー（40mer）（プレートに固定したキャプチャーオリゴマーとは相補性を示さない：配列番号6）を含む実施例1のハイブリダイゼーション溶液を（ $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $100\text{ }\mu\text{l}$ /ウェル）加えた。プレートをシールをし、 $42^\circ\text{C}$ 中で15時間置いた。

【0094】各ウェルの溶液を吸い取り、 $1\times\text{SSC}$ を加え（ $200\text{ }\mu\text{l}$ /ウェル）、室温下5分間放置した。この操作をあと2回行なった。

【0095】(3) 検出

実施例1(3)と同じ方法で行なった。その結果、M13 ssDNAを用いた系ではバックグラウンドと有意な差を示す吸収値を得たがコントロールであるpBR322

を用いた系ではバックグラウンドと有意な差は認められなかった。（結果を表4に示す。）

【0096】

【表4】

表4

DNA	吸収値 ( $A_{405}$ )
M13 ssDNA	0.54
pBR322 DNA	0.05

(バックグラウンド0.05)

【0097】

【実施例5】カルボコートアルミニウム蒸着膜に固定したIgGの標識抗IgGによる検出

(1) 金属板上へのIgGの固定

ガラス基板上にアルミニウムを $2000\text{ }\text{\AA}$ 蒸着した。この蒸着膜上にカルボジイミド化合物溶液1～4、6、10～13の各々 $0.5\text{ ml}$ をスピンコーターで被膜したものと、カルボジイミド化合物で被膜していないアルミニウム蒸着膜の各々に、ウサギIgG溶液（ $1\%$ ゼラチン、 $20\text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液  $\text{pH } 7.5$ 、 $0.5\text{ M}$   $\text{NaCl}$ ）を3ドットずつスポットし、室温で10分間固定した。これらのアルミニウム蒸着膜を洗浄液1（ $20\text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液  $\text{pH } 7.5$ 、 $0.5\text{ M}$   $\text{NaCl}$ 、 $0.05\%$  Tween 20）で10分間ずつ3回洗浄した。

【0098】(2) 抗原抗体反応によるウサギIgGの

## 検出

## (a) ブロッキング

ブロッキング溶液 (3%ゼラチン, 20mMトリス塩酸緩衝液 pH7.5, 0.5M NaCl) 中で30分間、25℃でブロッキングした。

## 【0099】 (b) 抗原抗体反応

アルカリファスファターゼ標識した抗ウサギヤギIgG溶液 (1%ゼラチン, 20mMトリス塩酸緩衝液 pH7.5, 0.5M NaCl, 0.05% Tween 20) 中で2時間、37℃でインキュベートした。未反応の抗体を、洗浄液1で10分間ずつ3回洗浄して除去した後、洗浄液2 (20mMトリス塩酸緩衝液 pH7.5, 0.5M NaCl) で置換した。

## 【0100】 (c) 発色操作

基質用緩衝液 (0.1Mトリス塩酸緩衝液 pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>) 1ml にBCIP溶液 (50mg 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート, 900ml ジメチルフォルムアミド) 3.2μl とNBT溶液 (50mg ニトロブルーテトラゾリウム, 1.8ml 70% ethanol) 6.4μl を混合した溶液を加え、室温で3時間発色させた。結果は表5に示した。

## 【0101】

## 【表5】

表5

カルボジイミド溶液	発色結果
なし	×
1	○
2	○
3	○
4	○
6	○
10	○
11	○
12	○
13	○

○: 発色した ×: 発色しない

## 【0102】

【実施例6】カルボコートプレートを使ったサンドイッチELISA

## (1) マイクロプレート上へのIFNγの固定

実施例1と同様の方法でカルボジイミド化合物を被膜させたポリスチレン製96穴マイクロタイタープレートに、1μg/μl抗ヒトインターフェロン (IFN) γ抗体溶液 (10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl) を1ウェルにつき100μlずつ分注し、4℃で一晩放置した。吸着されなかった抗

体は、洗浄溶液1 (リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 0.05% Tween 20) で5分間ずつ5回洗浄して除いた。

## 【0103】 (2) ブロッキング

ブロッキング溶液 (3%スキムミルク, 20mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 0.5M NaCl) を1ウェルにつき300μlずつ分注し、25℃で30分間ブロッキングした。

## 【0104】 (3) 抗原抗体反応

IFNγを緩衝液 (1%スキムミルク, 10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl) で400pg、200pg、100pg、50pg、25pg、12.5pgとなるように調製した標準液を、(1)で抗ヒトIFNγ抗体を固定化したマイクロタイタープレートに100μlずつ加えた。このプレートをシールした後、37℃で2時間インキュベートした。未反応の抗原は、洗浄液1で5分間ずつ5回洗浄して除いた。

【0105】次にアルカリフォスファターゼ標識抗IFNγ抗体溶液 (1%スキムミルク, 10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl) を1ウェルにつき100μlずつ加え、プレートをシールした後、37℃で2時間インキュベートした。反応しなかった抗体は、洗浄液1で5分間ずつ5回洗浄し除いた。

## 【0106】 (4) 発色操作

実施例1と同様にpNpp溶液を調製し、1ウェルにつき100μlずつ加えた。30℃で25分間反応させた後、0.1N NaOHを100μlずつ加えて発色を停止させ、生じた色の濃さを吸収波長405nmに調節したマイクロプレートリーダーで測定した。結果を表6に示した。

## 【0107】

## 【表6】

表6

IFNγ (pg/ml)	吸収値 (A <sub>405</sub> )
1.25	0.115
25	0.192
50	0.385
100	0.731
200	1.462
400	2.731

(バックグラウンド0.05)

## 【0108】

【実施例7】乳濁状のカルボコートポリスチレンラテックスを使った凝集法によるヒトプラスミノーゲンの検出  
(1) (1) カルボコートポリスチレンラテックス上へ

の抗ヒトプラスミノゲン抗体の固定

カルボジイミド化合物溶液3で被膜した直径0.15μmのポリスチレンラテックスを50mMホウ酸緩衝液 pH8.5で1重量%に調製した。この溶液を1mlとり、37℃に保温した後、抗ヒトプラスミノゲン抗体300μgを加え、37℃で1時間振盪した。この溶液を4℃、18,000rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。

#### 【0109】(2) ブロッキング

沈澱物を、3%牛血清アルブミン、50mMホウ酸緩衝液 pH8.5に懸濁し、37℃、1時間振盪した。この溶液を4℃、18,000rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。沈澱物は10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4に懸濁し、0.5重量%溶液とした。

【0110】(3) 凝集反応による吸光度変化の測定  
10mg/mlヒトプラスミノゲン溶液(3%牛血清アルブミン、10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl) 50μlと(1)及び(2)で調製した抗ヒトプラスミノゲン抗体を固定したラテックス溶液50μlを10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl 400μlに加え、混合した。この溶液の波長660nmにおける吸光度の変化を反応後30秒から120秒測定した。又、コントロールとして、10mg/mlヒトトランスフェリン溶液(3%牛血清アルブミン、10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl)についても同様の試験を行なった。結果は、表7に示した。

#### 【0111】

【表7】

表7

吸収値 (A <sub>660</sub> ) 変化量	
プラスミノゲン	0.52
トランスフェリン	0.005

#### 【0112】

【実施例8】乳濁状のカルボコートポリスチレンラテックスを使った凝集法によるヒトプラスミノゲンの検出  
(2) (1)カルボコートC-タイプポリスチレンラテックス上への抗ヒトプラスミノゲン抗体の固定  
カルボジイミド化合物溶液9で被膜した直径0.15μmのカルボキシル基含有ポリスチレンラテックスを50mMホウ酸緩衝液 (pH8.5)で1重量%に調製した。この溶液を1mlとり、37℃に保温した後、抗ヒトプラスミノゲン抗体300μgを加え、37℃で1時間振盪した。この溶液を4℃、18,000rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。

#### 【0113】(2) ブロッキング

沈澱物は、3%牛血清アルブミン、50mMホウ酸緩衝液 (pH8.5)に懸濁し、37℃、1時間振盪した。この溶液を4℃、18,000rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。沈澱物は10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)に懸濁し、0.5重量%溶液とした。

#### 【0114】(3) 凝集反応による吸光度変化の測定

10mg/mlヒトプラスミノゲン溶液(3%牛血清アルブミン、10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4), 150mM NaCl) 50μlと(1)及び(2)で調製した抗ヒトプラスミノゲン抗体を固定したラテックス溶液50μlを10mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4)、150mM NaCl 400μlに加え、混合した。この溶液の波長660nmにおける吸光度の変化を反応後30秒から120秒測定した。又、コントロールとして、10mg/mlヒトトランスフェリン溶液(3%牛血清アルブミン、10mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4, 150mM NaCl)についても同様の試験を行なった。結果は、表8に示した。

#### 【0115】

【表8】

表8

吸収値 (A <sub>660</sub> ) 変化量	
プラスミノゲン	0.55
トランスフェリン	0.005

#### 【0116】

【実施例9】乳濁状のカルボコートカルボキシルタイプポリスチレンラテックスを使った凝集法によるDNAの検出

(1)カルボコートラテックス上へのM13mp18ssの固定

カルボジイミド化合物溶液11で被膜した直径0.15μmのカルボキシル基含有ポリスチレンラテックスを50mMホウ酸緩衝液 (pH8.5)で1重量%に調製した。この溶液を0.5mlとり、37℃に保温した後、20μg/ml M13mp18ss溶液0.5mlを加え、37℃で2時間振盪した。この溶液を4℃、18,000rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。

#### 【0117】(2) プレハイブリダイゼーション

沈澱物を、プレハイブリダイゼーション溶液(5×SSC, 5×Denhardt's溶液, 25mMリン酸緩衝液 (pH6.6), 50%ホルムアミド, 0.5mg/ml変性サケ精子DNA)に懸濁し、42℃、1時間振盪した。この溶液を4℃、18,000rpm、1時

間の条件で遠心分離し、上清を除いた。沈澱物は10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、0.5重量%溶液とした。

#### 【0118】(3) ハイブリダイゼーション

(1)、(2) で調製したラテックス溶液200  $\mu$ l にハイブリダイゼーション溶液 (5  $\times$  SSC, 1  $\times$  Denhardt's 溶液, 25 mMリン酸緩衝液 (pH 6.6), 45%ホルムアミド, 0.2 mg/ml 変性サケ精子DNA, 20 ng/ml M13mp18 RF) 200  $\mu$ l を加えて混合し、42°C, 2時間振盪した。又、ハイブリダイゼーション溶液中の20 ng/ml M13mp18 RFをpBR322に置き換えたものをコントロールとして、同様に反応させた。

【0119】(4) 凝集反応による吸光度変化の測定  
この溶液の波長550 nmにおける吸光度の変化を調べるため、反応直後、及び反応から2時間後の吸光度を測定した。結果は、表9に示した。

#### 【0120】

【表9】

表9

DNA	吸収値 ( $A_{550}$ ) 変化量
M13mp18 ss	0.36
pBR322	0.001

#### 【0121】

【実施例10】乳濁状のカルボコートラテックスを使った凝集法によるヒトプラスミノーゲンの検出

(1) カルボコートラテックス上への抗ヒトプラスミノーゲン抗体の固定

カルボジイミド化合物溶液3で被膜した直径0.15  $\mu$ mのポリスチレンラテックスを50 mMホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で1重量%に調製した。この溶液を1 mlとり、37°Cに保温した後、抗ヒトプラスミノーゲン抗体300  $\mu$ gを加え、37°Cで1時間振盪した。この溶液を4°C、18,000 rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。

#### 【0122】(2) ブロッキング

沈澱物は、3%牛血清アルブミン、50 mMホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に懸濁し、37°C、1時間振盪した。この溶液を4°C、18,000 rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。沈澱物は10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、0.5重量%溶液とした。

【0123】(3) 凝集反応による吸光度変化の測定  
10 mg/ml ヒトプラスミノーゲン溶液 (3%牛血清アルブミン、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4), 150 mM NaCl) 50  $\mu$ l と (1) 及び (2) で調製した抗ヒトプラスミノーゲン抗体を固定

したラテックス溶液50  $\mu$ l を10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)、150 mM NaCl 400  $\mu$ l に加え、混合した。この溶液の波長660 nmにおける吸光度の変化を反応後30秒から120秒測定した。又、コントロールとして、10 mg/ml ヒトプラスミノーゲン溶液 (3%牛血清アルブミン、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4), 150 mM NaCl) についても同様の試験を行なった。結果は、表10に示した。

#### 【0124】

【表10】

表10

吸収値 ( $A_{660}$ ) 変化量	
プラスミノーゲン	0.62
トランスフェリン	0.005

#### 【0125】

【実施例11】乳濁状のカルボコートラテックスを使った凝集法によるDNAの検出

(1) カルボコートラテックス上へのM13mp18 ssの固定

カルボジイミド化合物溶液3で被膜した直径0.15  $\mu$ mのポリスチレンラテックスを50 mMホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で2重量%に調製した。この溶液を0.5 mlとり、37°Cに保温した後、20  $\mu$ g/ml M13mp18 ss溶液0.5 mlを加え、37°Cで2時間振盪した。この溶液を4°C、18,000 rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。

#### 【0126】(2) プレハイブリダイゼーション

沈澱物を、プレハイブリダイゼーション溶液 (5  $\times$  SSC, 5  $\times$  Denhardt's 溶液, 25 mMリン酸緩衝液 (pH 6.6), 50%ホルムアミド, 0.5 mg/ml 変性サケ精子DNA) に懸濁し、42°C、1時間振盪した。この溶液を4°C、18,000 rpm、1時間の条件で遠心分離し、上清を除いた。沈澱物は10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、0.5重量%溶液とした。

#### 【0127】(3) ハイブリダイゼーション

(1)、(2) で調製したラテックス溶液200  $\mu$ l にハイブリダイゼーション溶液 (5  $\times$  SSC, 1  $\times$  Denhardt's 溶液, 25 mMリン酸緩衝液 (pH 6.6), 45%ホルムアミド, 0.2 mg/ml 変性サケ精子DNA, 20 ng/ml M13mp18 RF) 200  $\mu$ l を加えて混合し、42°C、2時間振盪した。又、ハイブリダイゼーション溶液中の20 ng/ml M13mp18 RFをpBR322に置き換えたものをコントロールとして、同様に反応させた。

【0128】(4) 凝集反応による吸光度変化の測定

この溶液の波長 550 nm における吸光度の変化を調べるため、反応直後、及び反応から 2 時間後の吸光度を測定した。結果は、表 11 に示した。

【0129】

【表 11】

表 11

DNA	吸収値 ( $A_{550}$ ) 変化量
M13mp18ss	0.33
pBR322	0.001

【0130】

【実施例 12】カルボコート PET フィルムに固定したオリゴペプチドの ELISA 検出

(1) カルボコート PET フィルム上へのヒト ACTH の固定

カルボジイミド化合物溶液 1~4、6、10~13 で被膜した PET フィルムと被膜していない PET フィルムにヒト ACTH 溶液 (10 mM HEPES (pH 7.0)) をそれぞれ 3 ドットずつスポットし、室温で 10 分間固定した。

【0131】(2) 抗原抗体反応によるヒト ACTH の検出

(a) ブロッキング

ブロッキング溶液 (3%ゼラチン, 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 0.5 M NaCl) 中で 30 分間、25℃でブロッキングした。

【0132】(b) 抗原抗体反応

アルカリファスファターゼ標識した抗 ACTH-ヤギ IgG 溶液 (1%ゼラチン, 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 0.05% Tween 20) 中で 2 時間、37℃でインキュベートした。未反応の抗体を、洗浄液 1 で 10 分間ずつ 3 回洗浄して除去した後、洗浄液 2 (20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 0.5 M NaCl) で置換した。

【0133】(c) 発色操作

基質用緩衝液 (0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5), 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) 1 ml に BCIP 溶液 (50 mg 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート, 900 ml ジチルフォルムアミド) 3.2  $\mu$ l と NBT 溶液 (50 mg ニトロブルーテトラゾリウム, 1.8 ml 70% エタノール) 6.4  $\mu$ l を混合した溶液を加え、室温で 3 時間発色させた。結果は表 12 に示した。

【0134】

【表 12】

表 12

カルボジイミド溶液	発色結果
なし	×
1	○
2	○
3	○
4	○
6	○
10	○
11	○
12	○
13	○

○：発色した ×：発色しない

【0135】

【発明の効果】本発明により、タンパク質、核酸などの活性物質の検出において重要な担体への固定化を、簡便、効率的にかつ強固に行うことができる。

【0136】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA  
GAATTCGAGG GTACCCGGG ATCCTCTAGA

【0137】配列番号：2

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA  
CTAGAGGATC CCCGGGTACC CTCGAATTC

【0138】配列番号：3

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA  
AGCTAGCTAG CTAGCTAGCT AGCTAGCTAG

【0139】配列番号：4

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

CAAGCTTGCA TGCCTCCAGG TCGACTCTAG AGCATCCCT

【0140】配列番号：5

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

CTGACTGACT GACTGACTGA CTGACTGACT GACTGACTGA

【0141】配列番号：6

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

ACCTCCGGCT TAGGTTGGGT TATATAACTA TATGTAAAT

フロントページの続き

(72)発明者 岡田 小苗

東京都足立区西新井栄町1-18-1日清紡

績株式会社東京研究センター内